



Les cellules souches dans les insuffisances limbiques : où en est-on ?

Vincent Borderie

L'insuffisance limbique correspond à une perte complète ou partielle de la fonction des cellules souches de l'épithélium cornéen. La base du diagnostic clinique précoce est l'examen de la cornée en lumière bleue après instillation de fluorescéine et rinçage de la surface oculaire, le diagnostic de certitude reposant sur la microscopie confocale. L'évaluation précise de l'état de la surface oculaire et des annexes est un préalable au choix d'une stratégie thérapeutique : greffe de membrane amniotique, de tissu limbique, de cellules souches limbiques cultivées ou de cellules souches de la muqueuse buccale cultivées.

L'insuffisance limbique : quelle définition en 2015 ?

L'insuffisance limbique correspond à une perte complète ou partielle de la fonction des cellules souches de l'épithélium cornéen. Ces cellules souches assurent le renouvellement de l'épithélium cornéen dont le turnover est très rapide. Elles sont localisées au niveau du limbe au fond des cryptes limbiques situées entre les palissades de Vogt et se prolongeant dans l'épaisseur de la sclère, principalement dans les zones inférieure et supérieure du limbe, zones protégées des ultraviolets (UV) par les paupières. Ces cryptes représentent la niche des *cellules souches limbiques* (CSL) [1]. Le stroma qui entoure les cryptes et les mélanocytes présents dans les cryptes protègent les CSL des UV. Les cellules souches stromales présentes à proximité immédiate des CSL apportent des facteurs trophiques nécessaires à la survie des CSL. Les CSL sont des cellules souches adultes : elles ont un potentiel de division très élevé et un potentiel de différenciation multiple. Elles peuvent ainsi former de l'épithélium cornéen ou de l'épithélium conjonctival en fonction du stroma sous-jacent. Elles sont peu nombreuses, environ 2000 cellules par cornée, et interviennent en cas de destruction de l'épithélium. Le renouvellement homéostatique de l'épithélium cornéen et conjonctival serait plutôt dépendant de progéniteurs situés dans la couche basale de l'épithélium et répartis sur toute la surface oculaire.

Centre hospitalier national d'ophtalmologie des
Quinze-Vingts, Institut de la Vision, Paris

Dans quelles circonstances cliniques faut-il rechercher une insuffisance limbique ?

La principale cause d'insuffisance limbique est la *destruction des CSL par brûlure sévère* du limbe : brûlures caustiques (bases puis acides forts, *figure 1*), brûlures thermiques, radiations ionisantes. La perte des CSL peut être secondaire à une chirurgie touchant le limbe (cryo-application, cautérisation, souvent lors d'une chirurgie du décollement de rétine), des kératites infectieuses sévères, des tumeurs limbiques (carcinome in situ notamment), une pathologie auto-immune (syndrome de Stevens-Johnson, pemphigoïde oculaire cicatricielle), au port de lentille. L'aniridie qui est due à des mutations

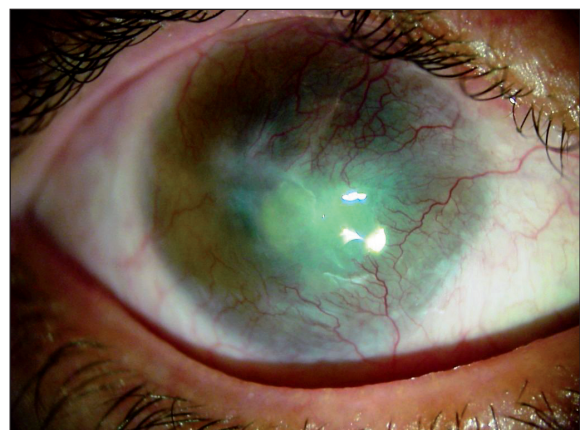


Figure 1. Insuffisance limbique complète après brûlure caustique. Le patient a déjà reçu cinq greffes de membrane amniotique. Acuité visuelle : 1/100.

du gène Pax-6 entraîne des anomalies des cellules souches stromales et une insuffisance limbique liée à l'atteinte de la niche limbique.

Comment arriver au diagnostic ?

L'examen de la cornée en lumière bleue après instillation de fluorescéine et rinçage de la surface oculaire est la base du diagnostic clinique précoce. En cas d'insuffisance limbique, *l'épithélium cornéen est hyperperméable à la fluorescéine (figure 2)*. Il apparaît anormalement fluorescent et irrégulier. Des défauts épithéliaux persistants ou chroniques ainsi qu'une néovascularisation cornéenne superficielle caractérisent également l'insuffisance limbique. À un stade évolué, on observe une conjonctivalisation de la surface cornéenne qui est recouverte par un épithélium terne, opaque et vascularisé. L'examen clinique doit évaluer l'étendue de l'atteinte : périphérique uniquement, périphérique et centrale, nombre de quadrants.

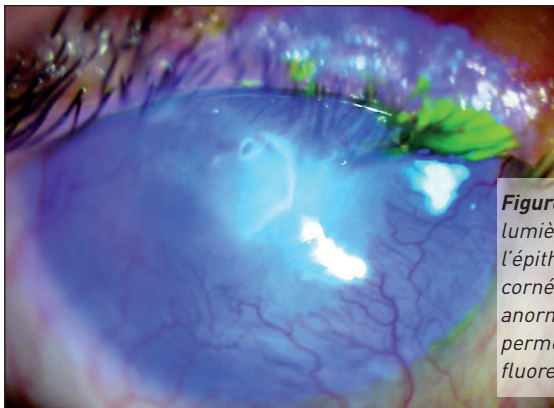


Figure 2. En lumière bleue, l'épithélium cornéen est anormalement perméable à la fluorescéine.

Le diagnostic de certitude repose actuellement sur la microscopie confocale. Celle-ci permet de visualiser la présence de cellules calciformes au sein de l'épithélium cornéen (signe pathognomonique de l'insuffisance limbique), la perte de l'architecture normale de l'épithélium cornéen (en trois assises cellulaires : basale, intermédiaire et superficielle, avec une densité élevée des cellules basales) qui est remplacé par un épithélium de phénotype conjonctival et l'atteinte de la niche limbique (perte des palissades de Vogt et des cryptes limbiques). Les empreintes cornéennes permettent également de rechercher les cellules calciformes et de réaliser un phénotypage de l'épithélium à l'aide de marqueurs de l'épithélium (cytokératines 3 et 12 pour le phénotype cornéen, cytokératine 19 pour le phénotype conjonctival).

Les traitements disponibles

La greffe de membrane amniotique

La greffe de membrane amniotique favorise la cicatrisation de l'épithélium cornéen et constitue un support pour l'adhésion et la migration des cellules épithéliales. Elle ne permet pas de traiter une insuffisance limbique totale (destruction de toutes les CSL) mais *permet d'améliorer les insuffisances limbiques partielles*. Elle peut être utilisée seule pour faire cicatriser un défaut épithélial chronique ou en association à un grattage de l'épithélium pathologique pour favoriser la recolonisation de la surface cornéenne à partir de zones d'épithélium sain.

La greffe de tissu limbique

Elle permet un apport de CSL et d'une niche limbique. Le greffon limbique est prélevé sur l'œil controlatéral sain (autogreffe de limbe) ou sur un œil donneur (allogreffe de limbe réalisée à partir d'un greffon cornéen ou à partir d'un donneur vivant apparenté).

- *L'autogreffe de limbe* nécessite le prélèvement d'environ un tiers de la circonférence limbique de l'œil sain et expose donc celui-ci, au moins en théorie, au développement d'une insuffisance limbique. Elle n'entraîne pas de rejet puisque le greffon est autologue. Le taux de succès en termes d'amélioration de l'état de la surface oculaire est de l'ordre de 80 à 90 %.
- *L'allogreffe de limbe* apporte des CSL mais également de nombreuses cellules immunogènes du donneur (cellules de Langerhans, cellules endothéliales vasculaires, leucocytes, lymphocytes). Elle est donc à haut risque de rejet et impose une *immunosuppression systémique* du receveur. Le taux de succès des allogreffes de limbe est très variable en fonction des études. Il est globalement de l'ordre de 50 %.

La greffe de cellules souches limbiques cultivées

Le principe consiste à réaliser une expansion des CSL au laboratoire. Le taux d'expansion est un facteur 10 [2]. Ceci permet de réaliser un greffon limbique autologue à partir d'une petite biopsie limbique (environ 1 mm) sans conséquences pour l'œil donneur. *Les CSL sont cultivées sur une membrane amniotique humaine sans feeders ou sur un support de fibrine avec des feeders animaux* (fibroblastes murins 3T3). Le taux de succès des greffes de CSL autologues cultivées (figure 3) est compris entre 60 et 100 % en fonction des études. La plus large série publiée provient d'Inde [3]. Elle inclut 200 greffes de CSL autologues cultivées sur membrane amniotique sans feeders, avec un suivi moyen de trois ans. L'amélioration de la surface oculaire est obtenue

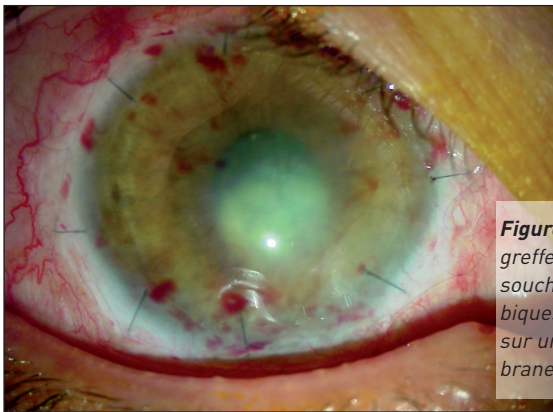


Figure 3. Auto-greffe de cellules souches limbiques cultivées sur une membrane amniotique.

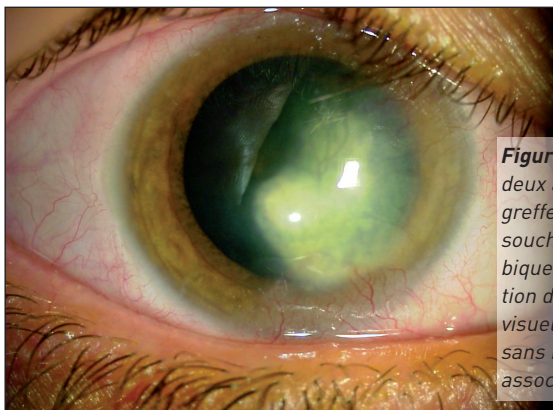


Figure 4. Aspect deux ans après la greffe de cellules souches limbiques. Récupération d'une acuité visuelle à 4/10 sans kératoplastie associée.

dans 70 % des cas et un gain d'acuité visuelle d'au moins 2 lignes est observé dans 60 % des cas (figure 4).

La technique de culture cellulaire au laboratoire permet de réaliser un greffon purement épithélial. Ceci évite de greffer des cellules immunogènes du donneur en cas de greffe allogénique. Le taux de succès des allogreffes de CSL cultivées est compris entre 40 et 70 %.

Une méta-analyse a récemment inclus 18 études rapportant les résultats des greffes de CSL cultivées sur membrane amniotique, soit un total de 562 yeux de 562 patients [4]. *Le taux de succès global est de 67 %, avec un intervalle de confiance de [59%-75%], le taux d'amélioration de l'acuité visuelle (2 lignes ou plus) est de 62% [57%-66%].* Cette méta-analyse ne montre pas de différences significatives entre autogreffes et allogreffes. Notre expérience des greffes de limbe et de CSL cultivées autologues et allogéniques montrent une supériorité des CSL cultivées en termes d'amélioration de la fonction visuelle.

La greffe de cellules souches de la muqueuse buccale cultivées

Il s'agit d'une autogreffe. Le greffon est produit à partir d'une biopsie de muqueuse buccale. Les cellules souches de la muqueuse buccale sont cultivées au labo-

ratoire ce qui permet une transdifférenciation avec acquisition d'un phénotype proche de celui des CSL. Cette technique permet de faire une autogreffe dans des pathologies bilatérales dès lors que l'origine n'est pas génétique. Le taux de succès est très variable en fonction des études, compris entre 42 et 100 %, avec un taux d'amélioration de la fonction visuelle plus faible que le taux de succès anatomique.

Quel traitement pour quel patient ?

L'évaluation précise de l'état de la surface oculaire et des annexes est un préalable au choix d'une stratégie thérapeutique. Seules les insuffisances limbiques complètes (atteinte du limbe sur 360° avec un épithélium cornéen central pathologique) relèvent de la greffe de cellules souches. La restauration de la fonction palpébrale, la présence d'une sécrétion lacrymale minimale et la conservation d'une innervation cornéenne sensitive sont indispensables pour envisager une greffe de cellules souches. Le choix entre thérapie cellulaire et greffe de tissu limbique prend en compte les possibilités pratiques, la thérapie cellulaire n'étant accessible actuellement en France que dans le cadre d'essais cliniques contrôlés.

L'avenir

Les techniques de bio-ingénierie tissulaire évoluant, il est probable qu'un greffon limbique comportant une niche limbique complète pourra prochainement être produit à partir de cultures de cellules souches (CSL, cellules souches stromales, iPS...). La thérapie génique est également une voie d'avenir avec la possibilité de créer des CSL à partir de cellules souches de la peau par transfection du gène PAX-6.

Pour en savoir plus

1. Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C *et al.* Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. *Exp Eye Res.* 2015. (sous presse)
2. Ghoubay-Benallaoua D, Sandali O, Goldschmidt P, Borderie V. Kinetics of expansion of human limbal epithelial progenitor cells in primary culture of explants without feeders. *PLoS One* 2013;8(12):e81965.
3. Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK *et al.* Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(11):1525-9.
4. Zhao Y, Ma L. Systematic review and meta-analysis on transplantation of ex vivo cultivated limbal epithelial stem cell on amniotic membrane in limbal stem cell deficiency. *Cornea.* 2015;34(5):592-600.